

Fuente : Diario Oficial de la Federación

NOM-089-SSA1-1994

NORMA OFICIAL MEXICANA , BIENES Y SERVICIOS. METODOS PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO MICROBIANO EN PRODUCTOS DE BELLEZA.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38 fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 3o. fracción XXII, 13, 194 fracción I, 197, 401-Bis-1 y 401-Bis-2 de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 40, 41, 1236, 1237, 1244 y 1245 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

CONSIDERANDO

Que con fecha 23 de marzo de 1994, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 4 de agosto de 1994, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana a efecto que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que en fecha previa fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación las respuesta a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-089-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODOS PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO MICROBIANO EN PRODUCTOS DE BELLEZA.

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes organismos e instituciones:
SECRETARIA DE SALUD.

Laboratorio Nacional de Salud Pública.

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

Facultad de Química.

AVON COSMETICS, S.A. DE C.V.

BEIERSDORF DE MEXICO, S.A. DE C.V.

CLAIROL DE MEXICO, S.A. DE C.V.

GILLETTE DE MEXICO, S.A. DE C.V.

YVES ROCHER DE MEXICO, S.A. DE C.V.

INDICE

- 0. INTRODUCCION
- 1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
- 2. FUNDAMENTO
- 3. DEFINICIONES
- 4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
- 5. DISPOSICIONES SANITARIAS
- 6. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO
- 7. MATERIAL Y EQUIPO
- 8. CUENTA TOTAL DE HONGOS, LEVADURAS Y MESOFILICOS AEROBIOS
- 9. IDENTIFICACION DE PATOGENOS
- 10. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
- 11. BIBLIOGRAFIA

12. OBSERVANCIA DE LA NORMA

13. VIGENCIA

0. Introducción

Las disposiciones de la presente Norma Oficial Mexicana son de orden público e interés social y establece los métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza, para asegurar que están libres de contaminación y son aptos para uso humano, de acuerdo con lo establecido por la Ley General de Salud, su Reglamento y demás disposiciones aplicables de la Secretaría de Salud.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece los métodos de prueba para determinar el contenido microbiano en productos de belleza, con el fin de conocer la calidad sanitaria y precisar si son aptos para uso humano.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar estos métodos.

2. Fundamento

Colocar una cantidad determinada de cosméticos o productos de belleza en medios de cultivo apropiados para poner de manifiesto la contaminación microbiana por bacterias, hongos y levaduras; después de su incubación realizar la cuenta del desarrollo e identificar los microorganismos potencialmente patógenos.

3. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

3.1 Aeróbico, microorganismo capaz de crecer en presencia de oxígeno libre.

3.2 Anaeróbico, microorganismo capaz de crecer en ausencia de oxígeno libre.

3.3 Aséptico, libre de microorganismos que son capaces de causar contaminación o enfermedad.

3.4 Bacterias, microorganismos unicelulares que derivan del reino vegetal, incluidos en el grupo de los Schycomysetes, su tamaño es variable y oscila entre 0,5-2 μ , algunos tienden a formar filamentos y pueden llegar a medir 30-40 μ . Por su forma se encuentran esféricas (cocos), bastones (bacilos) y espirales (vibrio), se reproducen por bipartición.

3.5 Contenido microbiano, el número de microorganismos mesofílicos aerobios viables, hongos, levaduras y microorganismos objetables (patógenos) presentes en productos de belleza, que determina si el producto es apto para el uso humano.

3.6 Estéril, medio totalmente libre de microorganismos viables.

3.7 Hongos, son organismos pertenecientes al reino Fungi, que se caracterizan por tener un cuerpo formado por estructura filamentosa con ramificaciones, que se conocen con el nombre de hifas, el conjunto de hifas constituye el micelio, carecen de clorofila, se alimentan por absorción, pudiendo propagarse por esporas flageladas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa o manana, macro o microscópicas y su coeficiente de sedimentación del RNAm es de 25 s.

Incluyen los Ordenes: Basidiomicetes, Ascomicetes, Deuteromicetes y Zygomycetes.

3.8 Levaduras, grupo de hongos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular. Poseen un núcleo y se multiplican por reproducción sexual o asexual. La forma común de reproducción es asexual, por gemación o por fisión transversal. La reproducción sexual cuando ocurre, es por medio de ascosporas contenida en un saco o asca.

3.9 Medio, cualquier material líquido, sólido o semisólido, que soporta el crecimiento de microorganismos.

Se le denomina medio de cultivo a las diferentes mezclas de sustancias nutritivas empleadas en el laboratorio para el cultivo de microorganismos.

3.10 Medios diferenciales, son los que permiten distinguir entre las colonias de un organismo determinado y las de otro.

3.11 Medios enriquecidos, son los que favorecen en general el desarrollo de los microorganismos.

3.12 Medios múltiples, son medios que tienen incluidas sustancias que nos permiten determinar una prueba bioquímica. Usualmente dichos medios contienen dos o más pruebas al mismo tiempo.

3.13 Medios selectivos, son medios sólidos que permiten el crecimiento de una clase de organismos, mientras que inhibe el de otros.

3.14 Organismos coliformes, son bacilos gram negativos, aerobios, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 horas cuando se incuban a 32-35°C. Una variedad de bacterias, muy abundantes y siempre presentes en la materia fecal del hombre y animales superiores; también pertenecen a ese grupo ciertas bacterias propias del suelo y vegetales.

3.15 Patógeno, un organismo que es capaz de causar enfermedad a un animal o planta.

4. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

UFC	Unidad formadora de colonias
lb	libras
g	gramos
ml	mililitros
μ	micras
°C	grados Celsius
p/v	peso sobre volumen
v/v	volumen sobre volumen
c.b.p.	cuanto basta para
Q.P.	químicamente puro
UV	ultravioleta
HCl	ácido clorhídrico
DNA	ácido desoxirribonucleico
H ₂ S	ácido sulfhídrico
EMB	agar eosina azul de metileno
AEM	agar extracto de malta
LIA	agar hierro y lisina
TSI	agar hierro y triple azúcar
ALM	agar Letthen modificado
AMC	agar MacConkey
PDA	agar papa dextrosa
AVJ	agar Vogel Johnson
CDS	caldo dextrosa Sabouraud
BHI	caldo infusión de cerebro corazón
CLM	caldo Letthen modificado
MIO	medio indol ornitina
MR-VP	medio rojo de metilo Voges Proskauer
No.	número

Cuando en la presente norma se mencione al Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

5. Disposiciones sanitarias

5.1 Los productos en los cuales se aplicarán los métodos objeto de esta norma, se encuentran establecidos en el Reglamento.

5.2 Los fabricantes podrán efectuar métodos diferentes a los incluidos en esta norma, para el control interno de sus productos; pero para efectos de comprobación de resultados por acciones de verificación sanitaria, se deben ajustar a los métodos de la presente norma.

6. Reactivos y medios de cultivo

Los reactivos empleados en esta prueba deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa. Cuando se hable de agua debe entenderse agua destilada.

6.1 Reactivos

Aceite mineral
Acetona
Acido acético 5 N
Acido clorhídrico
Acido oxálico
Acido sulfanílico
Acido tartárico
Alcohol amílico o butílico
Alfa naftilamino
Amoniaco concentrado
Cloruro de sodio
Cristal violeta

Diclorhidrato de N-N-dimetil p-fenilendiamina
Etanol absoluto
Fosfato monobásico de potasio
Hidróxido de potasio
Hidróxido de sodio al 10%
1-Naftol
Oxalato de amonio
Para dimetilamino benzaldehído
Peróxido de hidrógeno
Plasma de conejo o cobayo
Rojo de metilo
Safranina O
Sulfato de cobre
Telurito de potasio
Tween 80
Yodo
Yoduro de potasio
Zinc en polvo

6.2 Medios de cultivo

Agar cetrimida
Agar citrato de Simmons
Agar DNA azul-toluidina
Agar eosina azul de metileno
Agar extracto de malta
Agar hierro y lisina
Agar hierro y triple azúcar
Agar Letthen modificado
Agar MacConkey
Agar pseudomona F
Agar pseudomona P
Agar papa dextrosa
Agar sal-manitol
Agar sulfito de bismuto
Agar verde brillante
Agar Vogel-Johnson
Agar xilosa lisina desoxicolato (agar XLD)
Base de caldo tetracionato
Caldo cistina selenito
Caldo Dextrosa Sabouraud
Caldo infusión de cerebro corazón
Caldo Letthen modificado
Caldo lisina descarboxilasa
Caldo urea
Medio basal O/F (oxidativo-fermentativo)
Medio indol ornitina
Medio indol nitrito
Medio rojo de metilo Voges Proskauer
Medio SIM
Tiras API para pruebas bioquímicas

6.3 Preparación de reactivos y medios de cultivo

6.3.1 Reactivos

6.3.1.1 Solución salina al 0,85%

Cloruro de sodio 8,5 g
Agua c.b.p. 1 000,0 ml

Disolver el cloruro de sodio en 500 ml de agua, aforar a 1 000 ml, ajustar el pH a $7,2 \pm 0,1$ filtrar, envasar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.3.1.2 Solución de etanol 80% y HCl al 1% v/v

Etanol 8	0,0 ml
HCl	1,0 ml
Agua c.b.p.	100,0 ml

Mezclar el etanol y el HCl, aforar a 100 ml con agua y envasar.

6.3.1.3 Solución de tween 80%

Tween 80% sin diluir

Envasar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.3.1.4 Aceite mineral

Envasar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.3.1.5 Solución de Acido Tartárico al 10% p/v

Acido Tartárico	10,0 g
Agua c.b.p.	100,0 ml

Disolver el ácido tartárico en 50 ml de agua, aforar a 100 ml, envasar y esterilizar por filtración por membrana.

6.3.1.6 Solución de telurito de potasio al 1% p/v

Telurito de potasio	1,0 g
Agua c.b.p.	100,0 ml

Disolver el telurito en 50 ml de agua, aforar a 100 ml, envasar y esterilizar por filtración por membrana.

6.3.1.7 Solución de yodo-yoduro de potasio p/v

Yodo	6,0 g
Yoduro de potasio	5,0 g
Agua	20,0 ml

Disolver el yoduro de potasio en el agua y en esta solución disolver el yodo. Conservar en envases protegidos de la luz.

6.3.1.8 Solución de agua oxigenada al 3% v/v

Peróxido de Hidrógeno	3,0 ml
Agua c.b.p.	100,0 ml

Mezclar el peróxido en agua, aforar a 100 ml y envasar.

6.3.1.9 Solución indicadora rojo de metilo

Rojo de metilo	0,1 g
Alcohol al 95%	300,0 ml
Agua c.b.p.	500,0 ml

Mezclar el rojo de metilo en el alcohol y diluir con agua a 500 ml.

6.3.1.10 Reactivo de Griess-Ilosvays

Solución A

Acido sulfanílico	8,0 g
Acido acético 5N	1 000,0 ml

El ácido acético 5N se prepara agregándole un volumen de ácido acético glacial a 2,5 volúmenes de agua. Mezcle bien, añada luego el ácido sulfanílico y vuelva a mezclar.

Solución B

Alfa naftilamina	8,0 g
Acido acético 5N 1	000,0 ml

Mezclar y almacenar en refrigeración (4°C) cuando no esté en uso. Generalmente ambos reactivos son estables aproximadamente durante 3 meses.

6.3.1.11 Reactivo de Kovacs y Ehrlich

Para-dimetil-amino-benzaldehído	5,0 g
Alcohol amílico o butílico 7	5,0 ml
Acido clorhídrico (37%) Q.P.	25,0 ml

Disuelva el para-dimetil-amino-benzaldehído en el alcohol. Caliente suavemente la solución en un baño de agua tibia. Una vez disueltos los ingredientes, agregue el ácido clorhídrico con cuidado.

6.3.1.12 Reactivo de O'Meora

Hidróxido de potasio 40	0 g
Agua 100	0 ml

Disolver y enfriar. Añadir 0,3 g de creatinina (monohidrato) La solución reactiva, lista para el uso, puede conservarse en refrigeración (+4°C) durante 4 semanas aproximadamente.

6.3.1.13 Solución de sulfato de cobre según Leifson

Sulfato de cobre	1,0 g
Amoniaco concentrado	40,0 ml
Solución de sosa potásica al 10%	690,0 ml

Disolver el sulfato de cobre con amoniaco concentrado y añadir hidróxido de potasio al 10% que ha sido preparada con hidróxido de potasio.

6.3.1.14 Reactivo de Barrit

1-naftol A	5,0 g
Alcohol absoluto	100,0 ml

Disolver el 1-naftol en el alcohol y envasar.

6.3.1.15 Solución de cristal violeta

Cristal violeta	0,010 g
Acido acético glacial	10,0 ml

Disolver el cristal violeta en el ácido acético y envasar.

6.3.1.16 Solución yodo-yodurada

Yoduro de potasio	2,0 g
Yodo	1,0 g
Agua	100,0 ml

Triturar en un mortero el yodo y el yoduro de potasio, adicionar el agua necesaria para que se disuelva el yodo, agregar agua hasta un volumen de 100 ml. Conservar protegido de la luz.

6.3.1.17 Solución safranina

Safranina "O"	2,5 g
Alcohol etílico al 95%	100,0 ml

Disolver la safranina "O" en el alcohol etílico. Tomar 10 ml de esta solución y llevar a 100 ml con agua. Agitar.

6.3.1.18 Solución alcohol-acetona

Partes iguales de acetona y alcohol etílico al 95%.

6.3.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden prepararse a partir de medios comerciales deshidratados, o con los ingredientes que se especifican a continuación.

6.3.2.1 Medios nutritivos o de enriquecimiento

6.3.2.1.1 Agar Lethen modificado

Agar Lethen	32,0 g
Peptona de caseína	5,0 g
Peptona de carne	10,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Bisulfito de sodio	0,1 g
Agar	5,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final después de esterilizar $7,2 \pm 0,2$

Mezclar los componentes y calentar con agitación hasta la disolución completa del agar. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.3.2.1.2 Caldo Lethen modificado

Caldo Lethen	26,7 g
Peptona de caseína	5,0 g
Peptona de carne	10,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Bisulfito de sodio	0,1 g
Agua	1 000,0 ml

pH final después de esterilizar $7,2 \pm 0,2$

Mezclar los componentes hasta la disolución completa y distribuir 95 ml en botellas con tapón de rosca para dilución. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.3.2.1.3 Agar papa dextrosa

Infusión de papa	200,0 ml
Dextrosa	20,0 g
Agar	15,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final $5,6 \pm 0,2$

Suspender los ingredientes en un litro de agua agitando, remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Antes de usarse se licua, se enfría a $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$, se ajusta el pH a 3,5 con una solución de ácido tartárico al 10%.

6.3.2.1.4 Base de caldo tetratonato

Mezcla de peptonas	5,0 g
Mezcla de sales biliarias	1,0 g
Carbonato de calcio	10,0 g
Tiosulfato de sodio	30,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final $7,0 \pm 0,1$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua. Mezclar bien y calentar a ebullición. Dejar enfriar y envasar en tubos de ensayo estériles, en volúmenes de 10 ml cada uno.

Guardar en refrigeración. No esterilizar en autoclave. Momentos antes de usarlo agregar 0,2 ml (de 3 a 4 gotas) de la solución yodo-yoduro de potasio (6.3.1.7) a cada tubo. Usar el medio el mismo día en que se le agrega la solución de yodo.

6.3.2.1.5 Caldo Dextrosa Sabouraud

Polipeptona o neopeptona	10,0 g
Dextrosa	40,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar $5,6 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua. Remojar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente durante un minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. No sobrecalentar, ya que por su alto contenido en carbohidratos se oscurece y pierde eficacia.

6.3.2.2 Medios selectivos y diferenciales.

6.3.2.2.1 Agar MacConkey

Digerido pancreático de gelatina	17,0 g
Digerido pancreático de caseína	1,5 g
Digerido péptico de tejido animal	1,5 g
Lactosa	10,0 g
Mezcla de sales biliarias	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal Violeta	0,001 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar $7,1 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en 1 000 ml de agua, remojar de 10 a 15 minutos y calentar a ebullición agitando continuamente. Hervir durante un minuto, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfríar a $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$ y vaciar en cajas Petri unos 20 ml por placa. Dejar solidificar y luego invertir las cajas para evitar que se deposite un exceso de humedad en la superficie del medio.

6.3.2.2.2 Agar Vogel Johnson

Digerido pancreático de caseína	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Manitol	10,0 g
Fosfato dibásico de potasio	5,0 g

Cloruro de litio	5,0 g
Glicina	10,0 g
Agar	16,0 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar $7,2 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, mezclar, dejar remojar de 5 a 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar el medio entre 45 y 50°C y adicionar 20 ml de una solución estéril al 1 % de telurito de potasio. Agitar vigorosamente y distribuir unos 20 ml en cajas de Petri.

6.3.2.2.3 Agar de sal y manitol

Digerido pancreático de caseína	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Extracto de carne	1,0 g
D-manitol	10,0 g
Cloruro de sodio	75,0 g
Agar	15,0 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar $7,4 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y remojar 15 minutos. Mezclar y calentar a ebullición durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Distribuir porciones de 20 ml en cajas Petri de 15x100 mm.

6.3.2.2.4 Agar Cetrimida

Digerido pancreático de gelatina	20,0 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato de potasio	10,0 g
Agar	13,6 g
Cetil bromuro de trimetil amonio (cetrimida)	0,3 g
Glicerol	10,0 ml
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar $7,2 \pm 0,2$

Disolver en agua los componentes sólidos antes de adicionar el glicerol. Remojar unos 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.3.2.2.5 Agar eosina azul de metileno

Digerido pancreático de gelatina	10,0 g
Fosfato dibásico de potasio	2,0 g
Agar	15,0 g
Lactosa	10,0 g
Eosina "Y"	0,4 g
Azul de metileno (Metiltionina)	0,065 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar $7,1 \pm 0,2$

Disolver el digerido pancreático de gelatina, el fosfato dibásico de potasio y el agar en el agua. Esterilizar, dejar enfriar y antes de utilizar, agregar las siguientes soluciones a cada 100 ml de agar líquido: 5 ml de solución 1:5 de lactosa, 2 ml de solución 1:50 de eosina "Y" y 2 ml de solución 1:300 de azul de metileno. Mezclar.

6.3.2.2.6 Agar extracto de malta

Extracto de malta	30,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar $5,5 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, homogeneizar y remojar de 10 a 15 minutos, calentar agitando frecuentemente, hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Si el medio se

sobrecalienta el agar perderá su capacidad de gelificarse. Enfriar de 47-50°C y ajustar el pH a 3,5 con una solución de ácido tartárico al 10% estéril.

6.3.2.2.7 Caldo infusión de cerebro corazón

Infusión de cerebro de ternera	200,0 g
Infusión de corazón de res	250,0 g
Peptona de gelatina	10,0 g
Dextrosa	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 7,4 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y calentar ligeramente si es necesario. Se puede agregar 0,1% de agar si se desea. Envasar y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

6.3.2.2.8 Agar verde brillante.

Extracto de levadura	3,0 g
Mezcla de peptonas	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	20,0 g
Verde brillante	0,125 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,9 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y dejar remojar unos 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, dejar enfriar a 45-50°C y distribuir en cajas de Petri estériles.

6.3.2.2.9 Agar xilosa lisina desoxicolato (agar XLD)

Xilosa	3,5 g
L-Lisina	5,0 g
Lactosa	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	13,5 g
Desoxicolato de sodio	2,5 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
Citrato de hierro y amonio	0,8 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 7,4 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y dejar que se remoje de 10 a 15 minutos. Calentar con todo cuidado y agitando con frecuencia justamente hasta que el medio hierva. No sobrecalentar. Transfiera al baño de agua, dejar enfriar a 50°C y verter en cajas de Petri. El medio debe ser transparente y color rojo rubí anaranjado. El calentamiento excesivo o el mantener demasiado tiempo en baño de agua, puede ocasionar que se formen precipitados. En este caso se corre el riesgo de que las colonias sean de menor tamaño y presenten reacciones menos nítidas. Sin embargo el precipitado no perjudica el desarrollo bacteriano y puede eliminarse por filtración con papel filtro.

6.3.2.2.10 Agar Pseudomona F

Peptona de caseína	10,0 g
Peptona de carne	10,0 g
Sulfato de magnesio	1,5 g
Hidrogenofosfato dipotásico	1,5 g
Agar-agar	12,0 g
Glicerina	10,0 ml

Agua 1 000,0 ml

pH después de esterilizar $7,2 \pm 0,2$

Disolver en agua los componentes sólidos, adicionar la glicerina. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C . Dejar solidificar los tubos en posición inclinada o bien verter en placas.

6.3.2.2.11 Agar Pseudomona P

Peptona de gelatina 20,0 g
 Cloruro de magnesio 1,4 g
 Sulfato potásico 10,0 g
 Agar-agar 12,6 g
 Glicerina 10,0 ml
 Agua 1 000,0 ml

pH después de esterilizar $7,2 \pm 0,2$

Disolver en agua los componentes sólidos, adicionar la glicerina. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C . Dejar solidificar los tubos en posición inclinada o bien verter en placas.

6.3.2.2.12 Caldo Cistina Selenito

Mezcla de peptonas 5,0 g
 Lactosa 4,0 g
 Fosfato de sodio 10,0 g
 Selenito ácido de sodio 4,0 g
 Cistina 0,01 g
 Agua 1 000,0 ml

pH final $7,0 \pm 0,2$

Suspender 23 g del polvo en un litro de agua desionizada. Mezclar bien y calentar ligeramente hasta que el medio se disuelva. Envasar en tubos de ensaye, preferiblemente con tapas de rosca, volúmenes entre 10 y 15 ml por tubo. Esterilizar a vapor fluente durante 15 minutos. No en autoclave. No sobrecalentar. El medio así preparado y herméticamente tapado, puede conservarse en buenas condiciones, hasta 3 meses en refrigeración.

6.3.2.2.13 Agar Sulfito y Bismuto

Mezcla de peptonas 10,0 g
 Extracto de carne 5,0 g
 Dextrosa 5,0 g
 Fosfato disódico 4,0 g
 Sulfato ferroso 0,3 g
 Indicador de sulfito de bismuto 8,0 g
 Verde brillante 0,025 g
 Agar 20,0 g
 Agua 1 000,0 ml

pH final $7,5 \pm 0,2$

Suspender el polvo en un litro de agua, mezclar bien y remojar el medio deshidratado de 10 a 15 minutos para obtener un buen gel. Hervir no más de un minuto agitando continuamente para que se disuelva completamente el agar.

Dejar que el medio se enfríe a 45°C y sin dejar de agitarlo vacíe en cajas de Petri no menos de 20 ml de medio fluido. Las placas deben permanecer parcialmente descubiertas hasta que se seque la superficie del medio y usarlos el mismo día. Evite el sobrecalentamiento.

6.3.3 Medios para pruebas bioquímicas

6.3.3.1 Medio Basal O/F (de Hugh y Leifson)

Peptona Caseína 2,0 g
 Cloruro de sodio 5,0 g
 Fosfato dipotásico 0,3 g
 Azul bromotimol 0,03 g
 Agar 2,5 g
 Agua 1 000,0 ml

pH final $7,1 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando con frecuencia, hasta disolver el agar. Agregar 10 ml de solución de glucosa al 10% esterilizada por filtración (o del azúcar apropiado)

por cada 100 ml del medio fluido, mezclar y distribuir asépticamente 5 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a 118°C durante 10 minutos a fin de evitar la degradación del azúcar. El medio tiene un color verde.

6.3.3.2 Medio Indol Ornitina (MIO)

Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	10,0 g
Triptona	10,0 g
L-ornitina	5,0 g
Dextrosa	1,0 g
Agar	2,0 g
Bromocresol púrpura	0,02 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,5 ± 0,2

Disolver el medio deshidratado en un litro de agua, remojar unos 5 minutos, calentar a ebullición. Distribuir porciones de 4 ml en tubos de 10 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.3.3.3 Medio Indol Nitrito

(Medio de trip-caseína y nitrato)

Peptona de caseína	20,0 g
Fosfato disódico	2,0 g
Dextrosa	1,0 g
Nitrato de potasio	1,0 g
Agar	1,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 7,2 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua. Agregar 2 g de agar en el caso de hacerse movilidad y detección de gas. Calentar agitando continuamente y hervir durante más o menos un minuto hasta disolución total del medio. Envasar en tubos de ensayo hasta la mitad de su altura y esterilizar en autoclave durante 15 minutos. Si se prepara el medio semisólido, dejar que se solidifiquen los tubos en posición vertical.

6.3.3.4 Medio Rojo de Metilo Voges Proskauer

Peptona especial No. 1	7,0 g
Dextrosa	5,0 g
Fosfato dipotásico	5,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,9 ± 0,2

Disolver el medio deshidratado en un litro de agua, mezclar bien, si es necesario calentar un poco hasta disolución total. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

6.3.3.5 Agar Citrato de Simmons

Fosfato dehidrogenado de amonio	1,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Citrato de sodio	2,0 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Agar	15,0 g
Azul bromotimol	0,06 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,9 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, dejar remojar durante 5 a 10 minutos. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Distribuir volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Los tubos se dejan enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1 a 1,5 cm. Se puede emplear también como medio en placas.

6.3.3.6 Caldo urea

Urea	20,0 g
Fosfato monopotásico	9,1 g
Fosfato de sodio	9,5 g
Extracto de levadura	0,1 g

Rojo de fenol	0,01 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,8 ± 0,2

Disolver 38,61 g en 1 000 ml de agua, calentando en caso necesario a 60°C como máximo. Esterilizar por filtración o tras distribución a razón de 3 ml por tubo; o bien esterilizar con cuidado en marmita de vapor durante 5 minutos. No esterilizar en autoclave.

6.3.3.7 Agar lisina hierro

Peptona de gelatina	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Dextrosa	1,0 g
L-lisina	10,0 g
Citrato férrico-amónico	0,5 g
Trisulfato de sodio (anhidro)	0,04 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agar	15,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,7 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado, remojar unos 15 minutos, calentar para disolver los ingredientes agitando con frecuencia y hervir durante un minuto o hasta disolución completa. Distribuir en porciones de 4 ml en tubos con tapón de rosca de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave 12 minutos a 121°C. Dejar solidificar en posición inclinada a tener 4 cm de un extremo y 2,5 cm sesgado. Cerrar con cuidado las tapas a fin de evitar pérdidas de agua por evaporación.

6.3.3.8 Agar de hierro y triple azúcar.

Mezcla de peptonas 2	0,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Dextrosa	1,0 g
Sulfato de amonio férrico	0,2 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar	13,0 g
Tiosulfato de sodio	0,2 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 7,3 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 118°C durante 15 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1,5 a 2,0 cm.

6.3.3.9 Agar DNA azul toluidina

Acido desoxirribonucleico (DNA)	0,3 g
Agar	10,0 g
Cloruro de calcio (anhidro)	0,0011 g
Cloruro de sodio	10,0 g
Azul O toluidina	0,083 g
Tris (hidroximetil) aminometano	6,1 g
Agua	1 000,0 ml

Disolver el Tris (hidroximetil) aminometano en un litro de agua. Ajustar el pH a 9,0, adicionar los demás ingredientes excepto el azul O toluidina y calentar a ebullición para su disolución. Añadir al medio el color azul O toluidina. Distribuir en cajas Petri o portaobjetos.

6.3.3.10 Caldo de lisina y descarboxilasa

Peptona de gelatina	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Dextrosa	1,0 g
L-Lisina	5,0 g
Púrpura de bromocreso	1 0,02 g

Agua 1 000,0 ml

pH final $6,8 \pm 0,2$

Disolver el medio deshidratado en un litro de agua. Distribuir en porciones de 5 ml en tubos con tapón de rosca. La tapa debe de estar algo floja para permitir un buen intercambio de gases. Apretarla bien al terminar la esterilización. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.3.3.11 Medio SIM

Peptona de caseína 20,0 g

Peptona de carne 6,1 g

Sulfato de hierro y amonio 0,2 g

Tiosulfato de sodio 0,2 g

Agar 3,5 g

Agua 1000,0 ml

pH final $7,3 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, agitando frecuentemente. Remojar durante 10 minutos y hervir a ebullición durante un minuto. Distribuir en tubos de ensayo a una altura de unos 4 cm y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

7. Material y equipo

7.1 Material

Matraces Erlenmeyer de 2000, 1000, 500, 200 y 100 ml

Pipetas serológicas en 1/10 de 1, 2, 5, 10 y 25 ml

Vasos de precipitados de 80 y 500 ml

Probetas de 100, 500 y 1000 ml

Embudos de vidrio

Cajas de Petri 20 X 100 mm y 15 x 100 mm

Pipetas Pasteur

Tubos de ensayo 16 X 150 mm

Botellas de 100 ml para dilución con tapón de rosca

Botellas de dilución de leche de 250 ml

Codos de vidrio

Termómetros graduación de -10 a 200°C

Portaobjetos

Papel parafilm

Marcador

Masking tape

Gasa y algodón

Bolsas estériles de polietileno

Membrana de $0,45 \mu$

Porta filtro

7.2 Equipo

Estufa a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Estufa a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$

Refrigerador

Balanzas analítica y granataria

Potenciómetro

Autoclave

Horno para esterilizar

Recipiente para material contaminado

Espátulas

Microespátulas

Microscopio

Baño maría

Cuenta colonias

Asa y porta asa

Pinzas y tijeras

Esterilizar el material y equipo en autoclave (a 121°C durante 15 minutos) u horno (170-180°C durante 2 horas), según sea conveniente.

7.2.1 Cepas de referencia

Candida albicans (ATCC 10231)

Aspergillus niger (ATCC 16404)

Staphylococcus aureus (ATCC 6538)

Escherichia coli (ATCC 11105, 10536)

Salmonella typhi (LNA 99)

Pseudomona aeruginosa (ATCC 15442, 25619)

8. Cuenta total de hongos, levaduras y mesofílicos aerobios

8.1 Toma de muestra (del producto)

8.1.1 Analizar la muestra tan pronto como sea posible. Si es necesario almacenar, debe hacerse a la temperatura ambiente.

8.1.2 No incube, refrigere o congele las muestras antes o después de su análisis.

8.1.3 Inspeccione las muestras cuidadosamente antes de abrirlas y anote cualquier irregularidad del contenedor de dichas muestras.

8.1.4 Desinfecte la superficie del contenedor con un algodón estéril impregnado con cualquiera de los siguientes desinfectantes:

Solución de etanol al 70% (v/v) y ácido clorhídrico 1% (v/v) (alcohol ácido).

Solución de etanol al 70% con 4% de yodo

Solución de glutaraldehído al 2%

Benzal al 0,001%

8.1.5 Antes de abrir y tomar la muestra o contenido; secar la superficie con gasa estéril.

8.1.6 Homogeneizar el producto al tomar la muestra necesaria de acuerdo a su estado físico. Para líquidos, agitar el contenido del envase; para semisólidos y polvos, mezclar el contenido con una espátula estéril; para sólidos, raspar el producto con espátula estéril y tomar una muestra representativa; y para aerosoles, después de limpiar asépticamente el recipiente, expeler apropiadamente la cantidad de producto previa agitación.

8.2 Preparación preliminar de las muestras

8.2.1 Para las muestras que sean miscibles en CLM y CDS, adicionar 1 g o ml en 90 ml de CLM y 1 g o ml en 90 ml de CDS en condiciones asépticas.

8.2.2 Para las muestras que no sean miscibles en CLM y CDS (ejemplo, cremas, labiales, etc.), en 2 frascos estériles o bolsas de polietileno estériles debidamente etiquetados; uno para CLM y otro para CDS, adicionar 1 g o 1 ml de la muestra y agregar 0,5 ml de tween 80 estéril a cada uno de los frascos o bolsas previamente marcados y homogeneizar la muestra.

8.2.3 En caso de usar los frascos poner en baño maría a 45°C hasta formar una emulsión homogénea (el tiempo de exposición en el baño no debe exceder de 15 minutos).

8.2.4 Posteriormente agregar a cada uno de los frascos o bolsas 90 ml de CLM y 90 ml de CDS respectivamente y agitar perfectamente.

8.3 Procedimiento

8.3.1 Incubar a 30°C ± 2 durante 7 días los medios de cultivo inoculados. Marcar los frascos o bolsas que se enturbien al agregar la muestra.

8.3.2 Confirmar si existe crecimiento a los 2 y 7 días de incubación.

8.3.3 Cuando el crecimiento sea evidente o se tenga duda de desarrollo microbiano, hacer una resiembra en ALM y AEM, inoculando 0,5 ml de cultivo del CLM y CDS respectivamente, empleando el método de vaciado en placa o de dispersión con codos de vidrio esterilizado.

8.3.4 Incubar durante 4 días a 30°C ± 2.

8.4 Interpretación de resultados

Observar si hay crecimiento en los medios inoculados:

Si no hay crecimiento reportar: menos de 10 UFC/ml o g de muestra. Concluyendo el ensayo.

Si se presenta crecimiento, continuar con la prueba definitiva que se describe a continuación.

8.5 Cuenta total de mesofílicos aerobios, hongos y levaduras.

8.5.1 Procedimiento

Agregar por separado 10 ml o g de muestra a 90 ml de medio CDS y CLM (Dilución 10-1) cuando las muestras sean miscibles en éstos.

Para las muestras que no son miscibles; en dos frascos o bolsas estériles debidamente etiquetados: uno para CLM y otro para CDS, adicionar 10 g o ml de muestra y colocar 5 ml de tween 80 estéril a cada uno de los frascos o bolsas previamente marcados. En caso de usar los frascos poner en baño de agua a 45°C hasta formar una emulsión homogénea (el tiempo de exposición en el baño de agua no debe exceder de 15 minutos).

Posteriormente agregar a cada uno de los frascos o bolsas 85 ml de CLM y 85 ml de CDS respectivamente y agitar perfectamente. (Dilución 10-1)

A partir de la dilución 10-1, realizar diluciones seriadas según el crecimiento esperado de la siguiente manera:

TUBO	DILUCION	VOLUMEN AGREGADO	CLM o CDS (ml)
1	10-2 o 1:100	1 ml de dilución 10-1	9
2	10-3 o 1:1000	1 ml de dilución 10-2	9
3	10-4 o 1:10 000	1 ml de dilución 10-3	9
4	etc.		

Para la cuenta estándar total, realizar las diluciones en CLM; y para la cuenta de hongos y levaduras, realizar las diluciones utilizando el CDS. Mezclar hasta homogeneizar. Colocar 1 ml de cada dilución en cajas de Petri estériles previamente marcadas con la dilución, registro y fecha, agregar de 18 a 20 ml de medio de cultivo cuidando que la temperatura no sea mayor de 45°C; para cuenta estándar total, utilizar ALM; y para cuenta de hongos y levaduras, emplear AEM o PDA. Homogeneizar el inóculo en el medio de cultivo, rotando la caja sembrada de izquierda a derecha, vertical y horizontalmente 6 veces en cada ocasión. Dejar solidificar el medio de cultivo en las cajas. Si se emplea el método de dispersión con codos de vidrio, utilizar 0,5 ml de inóculo por cada dilución y colocarlo en cajas de Petri conteniendo ALM y AEM para cuenta estándar total y cuenta de hongos y levaduras respectivamente. Dispersar el inóculo con codos de vidrio estériles. Dejar que se absorba el inóculo. Invertir las cajas e incubar: a 30°C ± 2 durante 48 horas para la cuenta estándar total; a 22°C durante 5 días para la cuenta de hongos y a 35°C por 48 horas para la cuenta de levaduras.

8.5.2 Interpretación de resultados

8.5.2.1 Cuenta total de hongos y levaduras

Contar el número de hongos y levaduras que se encuentren.

Reportar el número de colonias /ml o g de muestra multiplicando por el inverso de la dilución observada.

En el caso de utilizar el método por dispersión de codo de vidrio, el resultado se multiplicará por 2. Concluyendo la prueba.

8.5.2.2 Cuenta total de mesofílicos aerobios

Contar las cajas en donde se encuentren de 25 a 250 UFC.

Reportar el número de UFC/ml o g de muestra multiplicando por el inverso de la dilución observada. En el caso de utilizar el método por dispersión con codo de vidrio, el resultado obtenido se multiplicará por 2.

Para identificación de microorganismos patógenos se continuará con el punto siguiente.

9. Identificación de patógenos

9.1 Procedimiento

Incubar los tubos de la dilución 1:100 o 1:1000 de CLM utilizados para la cuenta estándar total, durante 7 días a 30°C ± 2. A partir de los tubos inoculados sembrar una azada en los siguientes medios de cultivo diferenciales: agar cetrinida, EMB, AMC y AVJ. Incubar de 33 a 37°C durante 24 horas los medios de EMB y AMC, y 48 horas el agar cetrinida y AVJ.

Observar las cajas inoculadas para búsqueda de E. coli,

S. Typhi, S. aureus y Ps. sp. en los medios respectivos (ver Tabla 1).

Tabla No. 1

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	CARACTERISTICAS COLONIALES
Agar eosina azul de metileno	E. coli	Colonias pequeñas azul negro en la parte central con brillo metálico verdoso a la luz reflejada
	Salmonella	Transparentes, color ámbar
	Staphylococcus coagulasa (+)	Colonias incoloras, en punta de alfiler
Agar MacConkey	Salmonella, Shigella y otros	Incoloros, transparentes
	E. coli	Grandes, rojas, que pueden estar rodeadas de una zona de precipitación de bilis
	Enterobacter, Klebsiella	Grandes, rosadas, mucosas
	Enterococos, Staphylococcus y otros	Diminutas, de crecimiento aislado, opacas
Agar cetrimida	Ps. sp.	Colonias grandes blancas o verdes cremosas
	E. coli	Crece poco, sin pigmento
	S. aureus	No crece
Agar Vogel Johnson	S. aureus	Colonias pequeñas, negras, con halo amarillo.
	S. epidermidis y otros	Pequeñas, negro-grisáceas, sin halo
	E. coli	No crece
	Ps. aeruginosa	No crece

9.2 Tinción de Gram

Si se observan colonias sospechosas de los microorganismos antes mencionados, de acuerdo a la Tabla No. 1, realizar una tinción de Gram para identificar morfología microscópica.

9.2.1 Procedimiento

Preparar un frotis de microorganismos provenientes de un cultivo de 24-48 horas de incubación. Aplicar calor suave al portaobjetos con la llama de un mechero o de una lámpara de alcohol de manera paulatina. El calentamiento no debe ser excesivo ni violento. Enfriar y aplicar sobre el frotis unas gotas de solución de cristal violeta, dejar actuar un minuto. Lavar con agua y escurrir. Aplicar unas gotas de la solución yodo-yodurada con mordente, dejar actuar un minuto. Lavar con agua y escurrir. Decolorar el frotis con unas gotas de la solución alcohol-acetona, durante no más de 10 segundos. Lavar con agua y escurrir. Aplicar unas gotas de la solución de safranina, dejar actuar entre 15 y 30 segundos. Lavar con agua, inclinar el portaobjeto para dejar escurrir el exceso de agua y secar los bordes con papel secante.

9.2.2 Interpretación de resultados

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Las bacterias Gram positivas, se observan teñidas de color azul violáceo intenso.

Las Gram negativas se observan de color rojo.

9.3 Identificación de S. aureus

En caso de encontrar cocos en racimo Gram positivos, continuar con las siguientes pruebas para búsqueda de S. aureus.

9.3.1 Prueba de catalasa

Aislar la colonia sospechosa en ALM, incubar a 33-37°C durante 18-24 horas. Si se observa crecimiento, realizar la prueba de catalasa como se indica a continuación: en un portaobjetos adicionar una gota de solución de agua oxigenada al 3% y dispersar una porción de la colonia sospechosa. La reacción es positiva si se observan burbujas efervescentes del oxígeno desprendido, utilizar controles positivos y negativos.

Aislar en agar de sal y manitol o AVJ, incubando a 33-37°C durante 24-48 horas. Observar si hay colonias fermentadoras de manitol. Resembrar en medio de oxidación-fermentación con dextrosa, incubar a 33-37°C durante 18-24 horas, y observar si hay desarrollo microbiano.

Sembrar las colonias sospechosas en dos tubos con BHI, uno destinado para la técnica de coagulasa y otro para la técnica de termonucleasa, incubar a 35°C de 18-24 horas.

Reportar de acuerdo a la Tabla No. 2

9.3.2 Prueba de coagulasa

9.3.2.1 Procedimiento (método 1)

Con la ayuda de una asa, transferir individualmente las colonias sospechosas de las cajas en que se desarrollaron de cualquiera de los dos medios de cultivo, de agar sal y manitol o AVJ para estafilococo, a tubos individuales que contengan 0,5 ml de plasma de conejo o de cobayo. Incubar en baño maría a 35°C durante una hora, observar a las 3 horas y después a distintos intervalos hasta las 24 horas.

Reportar positiva la prueba si hay formación de coágulo pequeño pero bien constituido o una coagulación total de la mezcla.

Correr en paralelo el mismo procedimiento con el testigo, éste debe dar la prueba positiva.

9.3.2.2 Procedimiento (método 2)

Adicionar a cada tubo 0,5 ml de BHI. Transferir cada colonia sospechosa de las cajas en las que se desarrollaron al caldo con ayuda de una asa. Hacer lo mismo con el control positivo. Incubar 24 horas a 35°C. Posteriormente adicionar a cada tubo 0,5 ml de plasma. Incubar 3 horas en baño de agua, entre 35-37°C sin movimiento.

9.3.2.3 Interpretación de resultados

La presencia de un coágulo dará la prueba positiva, de lo contrario se procederá a continuar la incubación hasta 24 horas.

Si al transcurrir el tiempo no se observa coágulo, la prueba se considera negativa.

NOTA: No todos los tipos de *S. aureus* son coagulasa positiva.

9.3.3 Prueba de la termonucleasa

Al otro tubo sembrado en BHI, practicar la prueba de la termonucleasa, corriendo dicha prueba con un control positivo.

9.3.3.1 Procedimiento (método 1)

En una caja de Petri desechable con 10 ml de medio de cultivo, agar DNA azul toluidina, se efectúan orificios de 2 mm de diámetro.

Calentar en baño maría durante 15 minutos el cultivo de *Staphylococcus aureus* seleccionado.

Colocar una gota del cultivo obtenido en alguno de los orificios e identificarlo, incubar a 37°C durante 24 horas.

9.3.3.2 Procedimiento (método 2)

Inactivar el cultivo en baño maría durante 15 minutos. En un portaobjetos con agar DNA azul toluidina, aplicar en oradaciones de 2 mm de diámetro (previamente realizadas) la muestra y el control positivo. Incubar durante 24 horas de 35-37°C.

9.3.3.3 Interpretación de resultados

Transcurrido el tiempo de incubación, observar vire del agar de morado a violeta o rosa y la presencia de halo.

Se da como positiva la prueba con la presencia de un halo color rosa alrededor de los orificios que indican hidrólisis del DNA.

Reportar: *Staphylococcus aureus* termonucleasa positiva.

Tabla No. 2

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE <i>S. aureus</i>			
DETERMINACION	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
Prueba de catalasa	+	-	-
Fermentación de manitol	+	-	-
Crecimiento en O/F	fermentativo		
Prueba de Coagulasa	+	-	-
Prueba de Termonucleasa	+		
Vogel Proskauer	+		-
Oxidasa	-		-
Reducción de nitratos	+		d

d= variable

9.4 Pruebas bioquímicas empleadas

9.4.1 Prueba de oxidasa

La prueba de oxidasa se realiza de la siguiente manera: impregnar una tira de papel filtro en diclorohidrato de N-N dimetil p-fenilendiamina y sobre ella colocar una porción de la colonia sospechosa. La prueba es positiva si se produce un color que va de rosa a púrpura.

9.4.2 Prueba en TSI

Sembrar el cultivo puro sometido a ensayo tanto por estría en la superficie inclinada como en la columna vertical, mediante estría central. Incubar 48 horas a 37°C.

9.4.2.1 Interpretación de resultados

- A = Viraje a rojo por formación de álcali.
- OA = Sin alteración del color original del medio de cultivo o rojo por formación de álcali.
- S = Viraje a amarillo, por formación de ácido.
- SG = Viraje a amarillo y formación de gas.
- + = Ennegrecimiento por formación de H₂S.
- = Ausencia de ennegrecimiento.

9.4.3 Prueba en LIA

Sembrar el cultivo puro sometido a ensayo, tanto por estría sobre la superficie inclinada como por picadura central en la columna vertical subyacente. Incubar de 16-18 horas a 37°C.

9.4.3.1 Interpretación de resultados

- Violeta = Viraje del indicador de pH púrpura de bromocresol por la descarboxilación de lisina y la consecuente alcalinidad.
- Amarillo = Fermentación de glucosa con la consecuente acidez del medio.
- Negro = Formación de coloración negra por el H₂S y producción de sulfato de hierro.

9.4.4 Prueba en medio basal O/F (de Hugh y Leifson)

A partir del cultivo puro sometido a ensayo, que se encuentre lo más posible en la fase logarítmica de multiplicación, sembrar por el procedimiento de picadura hasta el fondo, un tubo con recubrimiento de parafina y otro tubo sin tal recubrimiento para cada carbohidrato elegido. Incubar 48 horas como mínimo a la temperatura de 35°C.

9.4.4.1 Interpretación de resultados

- Amarillo en ambos tubos = Fermentación del correspondiente carbohidrato.
- Amarillo en tubo no recubierto = Degradación oxidativa del carbohidrato. Oxidación en la superficie.
- Movilidad = Si la turbidez se extiende en la totalidad del medio.
- Gas = Observar formación de gas.

9.4.5 Prueba en agar citrato de Simmons

Sembrar el cultivo puro por estría, en la superficie del medio de cultivo e incubar de 24 a 48 horas a 37°C.

9.4.5.1 Interpretación de resultados

- Positivo = Medio de cultivo azul oscuro.
- Negativo o inhibido = Sin cambio.

9.4.6 Prueba en caldo urea

Sembrar masivamente con el cultivo puro, objeto de ensayo. Incubar hasta 48 horas a 37°C.

9.4.6.1 Interpretación de resultados

- Rojo = Urea positivo.
- Amarillo = Urea negativo.

9.4.7 Prueba en medio MR-VP

9.4.7.1 Procedimiento

Sembrar en dos tubos de caldo MR-VP con el cultivo puro, objeto de investigación. Incubar hasta 4 días a 37°C.

A continuación se realizan los ensayos:

9.4.7.1.1 Prueba del rojo de metilo: añadir al primer tubo unas 5 gotas de la solución indicadora de rojo de metilo.

9.4.7.1.2 Prueba de Voges-Proskauer: al segundo tubo se le añaden 5 ml de la solución de sulfato de cobre según Leifson o 3 ml de reactivo de Barritt y un ml de hidróxido de potasio al 40% o 5 ml de reactivo de O'Meora. En caso positivo se presenta para los dos primeros métodos después de algunos minutos, un viraje a rojo. Con el reactivo de O'Meora aparece en caso positivo y tras frecuente agitación, una coloración rosa al cabo de unos 20 minutos, iniciándose en la superficie y que se intensifica en el transcurso aproximado de 2 horas.

9.4.7.2 Interpretación de resultados

- De anaranjado a rojo = positivo por utilización de glucosa.
- De anaranjado a amarillo = negativo.

Rojo = Positivo, por formación de acetoina a partir de glucosa.

Sin reacción = negativo.

9.4.8 Prueba en Medio indol nitrito

9.4.8.1 Formación de nitritos:

Para investigar nitritos utilice 3 tubos separados; uno para el control positivo (*E. coli*), otro para el control negativo y el tercero para la prueba con la cepa en estudio. Inocule masivamente cada tubo por punción. Incube a 35°C de 12 a 24 horas. Agregue aproximadamente 10 gotas (mezcla de partes iguales de las soluciones A+B) del reactivo Griess-Ilosvays.

9.4.8.2 Interpretación de resultados

La formación de un color rojo en uno o 2 minutos indica reducción de nitratos a nitritos (prueba positiva). Si la cantidad de nitritos es elevada el color rojo cambia a amarillo.

Si no aparece color, agregue a los tubos una pizca de zinc en polvo (libre de nitratos y de nitritos)

Observe si se forma el color rojo o el cultivo permanece incoloro.

Si no hubo reducción del nitrato presente en el medio de cultivo por el microorganismo, el zinc lo reducirá a nitrito y se formará un color rojo al reaccionar con el reactivo de Griess-Ilosvays. La prueba entonces será negativa (ausencia de nitrata).

Si no aparece color, esto nos indica que el germen redujo el nitrato presente en el medio de cultivo hasta más allá de la formación de nitritos, posiblemente llegando la reacción hasta nitrógeno gaseoso. La prueba entonces es positiva (presencia de nitrata).

9.4.8.3 Formación de indol

Recubrir el medio con una capa de aproximadamente 0,5 cm de altura del reactivo del indol según Kovacs.

En presencia del indol libre, se presenta al cabo de pocos minutos una coloración rojo cereza en la capa del reactivo.

9.4.9 Prueba en medio SIM

9.4.9.1 Procedimiento

El cultivo puro sometido a examen se siembra por punción en la capa superior del medio de cultivo y se incuba de 18-24 horas a 37°C.

9.4.9.2 Interpretación de resultados

La movilidad se pone de manifiesto por la turbidez difusa del medio de cultivo alrededor del canal de la picadura.

La no movilidad se caracteriza por el crecimiento producido exclusivamente a lo largo de dicho canal. La formación de H₂S se reconoce por el ennegrecimiento de la zona de crecimiento.

La demostración del indol se efectúa mediante el reactivo de Kovacs. La formación del indol da lugar a una coloración rojo púrpura de la capa de reactivo.

También puede usarse con el mismo propósito la tira de papel filtro impregnada con una solución de ácido oxálico. Esta se coloca seca, en la boca del tubo, virando a un color rosado en el caso de formación de indol.

9.4.10 Prueba en medio MIO

9.4.10.1 Procedimiento

Los cultivos son inoculados por punción en el medio MIO preparado en tubos y se incuban de 18-24 horas a 35°C.

Se leen las reacciones de movilidad y de ornitina descarboxilasa antes de agregar el reactivo de Kovacs para la prueba de indol.

9.4.10.2 Interpretación de resultados

La movilidad es indicada por turbidez del medio o por crecimiento extendido a partir de la línea de inoculación.

La ornitina descarboxilasa es indicada por el color púrpura del medio.

La ornitina negativa produce un color amarillo, en el fondo puede ser púrpura al final.

Para la prueba de indol se añaden de 3-4 gotas de reactivo de Kovacs, y se agita suavemente el tubo. La aparición de color rosa o rojo en el reactivo se interpreta como prueba positiva de indol.

Comparar los resultados obtenidos con un tubo testigo sin sembrarse

9.4.11 Prueba en caldo lisina descarboxilasa

9.4.11.1 Procedimiento

Los tubos con el caldo se inoculan con los microorganismos de prueba y se incuban durante 24 horas de 32-35°C o si se prefiere a 37°C.

Los bacilos entéricos producen ácido en la fermentación inicial de dextrosa, ocasionando un cambio de color amarillo.

Los cultivos que también producen descarboxilación de la lisina, forman cadaverina y el caldo vuelve a tomar el color púrpura alcalino.

9.4.11.2 Interpretación de resultados

Un color amarillo después de 24 horas indica un resultado negativo.

El color púrpura es un resultado positivo que indica la descarboxilación de la lisina.

9.5 Identificación de bacterias Gram negativas

9.5.1 Pruebas para identificación de *Pseudomona* sp.

9.5.1.1 Procedimiento

En caso de que en el medio agar cetrimida se encuentren colonias sospechosas de *Pseudomona* sp., realizar la prueba de oxidasa y una tinción de Gram (Tabla No. 3).

Observar con luz ultravioleta las colonias desarrolladas y comparar la morfología colonial conforme a la Tabla No. 3.

Tabla No. 3

CARACTERISTICAS DE <i>Pseudomona</i> sp.			
Medio de cultivo	Morfología colonial	Tinción de Gram	Prueba de oxidasa
Agar cetrimida a 37°C o 42°C	Colonias grandes blancas o verdes cremosas.	Bacilos -	+
Agar <i>Pseudomonas</i> F para obtención de fluoresceína	Colonias incoloras o amarillentas, con luz ultravioleta se observan de color amarillento.	Bacilos -	+
Agar <i>Pseudomonas</i> P para detección de piocianina	Colonias verde-azulosas. Con luz ultravioleta se observan de color azul.	Bacilos -	+

9.5.1.2 La presencia de *Pseudomona* sp. puede confirmarse, si es necesario, con pruebas bioquímicas mencionadas en los puntos del 9.4.1 al 9.4.11 y comparar con la Tabla No.4.

Tabla No. 4

<i>Pseudomona</i> sp.	
Pruebas bioquímicas	Resultado
H ₂ S (formación)	-
Movilidad	+
Indol	-
Urea	d
Lisina descarboxilasa	-
Lactosa	-
VP	d
Citrato de Simmons	+
Manitol	d
Glucosa (gas)	d
Sorbitol	-
Inositol	-
OF/F	-
OF/O	+

+ = Positivo

- = Negativo

d = Variable

9.5.2 Pruebas para identificación de *Salmonella* sp.

En caso de que en los medios EMB o AMC se encuentren colonias sospechosas de *Salmonella* (cuadro No. 1), sembrarlas en medio caldo cistina-selenito y caldo tetratonato, incubar durante 12-24 horas a 37°C o 43°C.

9.5.2.1 Pruebas selectivas para *Salmonella* sp.

Si se presenta crecimiento en cualquiera de los medios de enriquecimiento, tomar una azada y aislar por estría cruzada en los siguientes medios: agar verde brillante, agar XLD y agar sulfito de bismuto.

Si son bacilos Gram negativos, correspondiendo a la morfología de Salmonella sp., sembrar por estría y punción en el medio agar triple azúcar-hierro e incubar de 18 a 24 horas a 35°C.

Observar las morfologías coloniales y microscópicas y compararlas con las descritas en la Tabla No.5.

Tabla No. 5

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE Salmonella sp.		
Medio de cultivo	Características morfológicas	Tinción de Gram
Agar verde brillante	Colonias pequeñas transparentes, incoloras, rosas o blancas opacas, frecuentemente rodeadas de una zona rosa o roja.	Bacilos -
Agar xilosa-lisina desoxicolato	Colonias rojas con o sin centro negro.	Bacilos -
Agar sulfito de bismuto	Colonias negras o verdes	Bacilos -
Agar hierro triple azúcar	Superficie alcalina (roja) punción ácida (amarilla), con o sin producción de ácido sulfhídrico (negro)	Bacilos -

9.5.2.2 Para confirmación de Salmonella realizar las pruebas bioquímicas mencionadas en los puntos del 9.4.1 al 9.4.11 y comparar con la Tabla No. 6.

Tabla No. 6

Salmonella typhi	
Pruebas bioquímicas	Resultado
TSI: Superficie	K
Punción	A
Gas	-
H ₂ S	+
LIA: Superficie	K
Punción	K
Gas -	
H ₂ S	+ (-)
MIO: Movilidad	+(-)
Indol	-
Ornitina	-
Urea	-
Lisina descarboxilasa	+
Malonato	-
Lactosa -	
VP	-
Citrato de Simmons	-
Manitol	+
Glucosa (gas)	-
Sorbitol	+
Ornitina Descarboxilasa	-
Dulcitol	d
Inositol	-
Triolosa	+
Arabinosa	-
Ramnosa	-
Celobiosa	d
Eritritol	-
Acetato de sodio	-
Mucato	-
Fucsina glicerol	-

K= Alcalino

A= Acido

+= Positivo

-= Negativo

d= Variable

9.5.3 Pruebas selectivas para *Escherichia coli*.

9.5.3.1 Procedimiento

En caso de que encuentren colonias sospechosas de *E. coli* (Tabla No. 1), sembrar por estría cruzada en los medios AMC y agar Levine-eosina azul de metileno e incubar a 35°C. Observar el crecimiento y si ninguna colonia corresponde a la morfología descrita en la Tabla No.1, la muestra cumple los requisitos de ausencia de *Escherichia coli*.

Confirme la presencia utilizando las pruebas bioquímicas mencionadas en los puntos del 9.4.1 al 9.4.11 y comparar con la Tabla No. 7.

Tabla No. 7

Escherichia coli	
Pruebas bioquímicas	Resultado
TSI: Superficie	A
Punción	A
Gas	+
H ₂ S -	
LIA: Superficie	K
Punción	A
Gas	+
H ₂ S	-
MIO: Movilidad	+(-)
Indol	+
Urea -	
Lisina descarboxilasa	+
Malonato -	
Lactosa	+
VP	-
Citrato de Simmons -	
Manitol	+
Glucosa (gas)	A
Sorbitol	+
Ornitina descarboxilasa	d
Dulcitol	d
Inositol	-
Triolosa	+
Arabinosa	+
Ramnosa	d
Eritritol	-
OF/F y OF/O	+
Mucato	+

K= Alcalino

A= Acido

+= Positivo

-= Negativo

d= Variable

9.6 Pruebas bioquímicas API

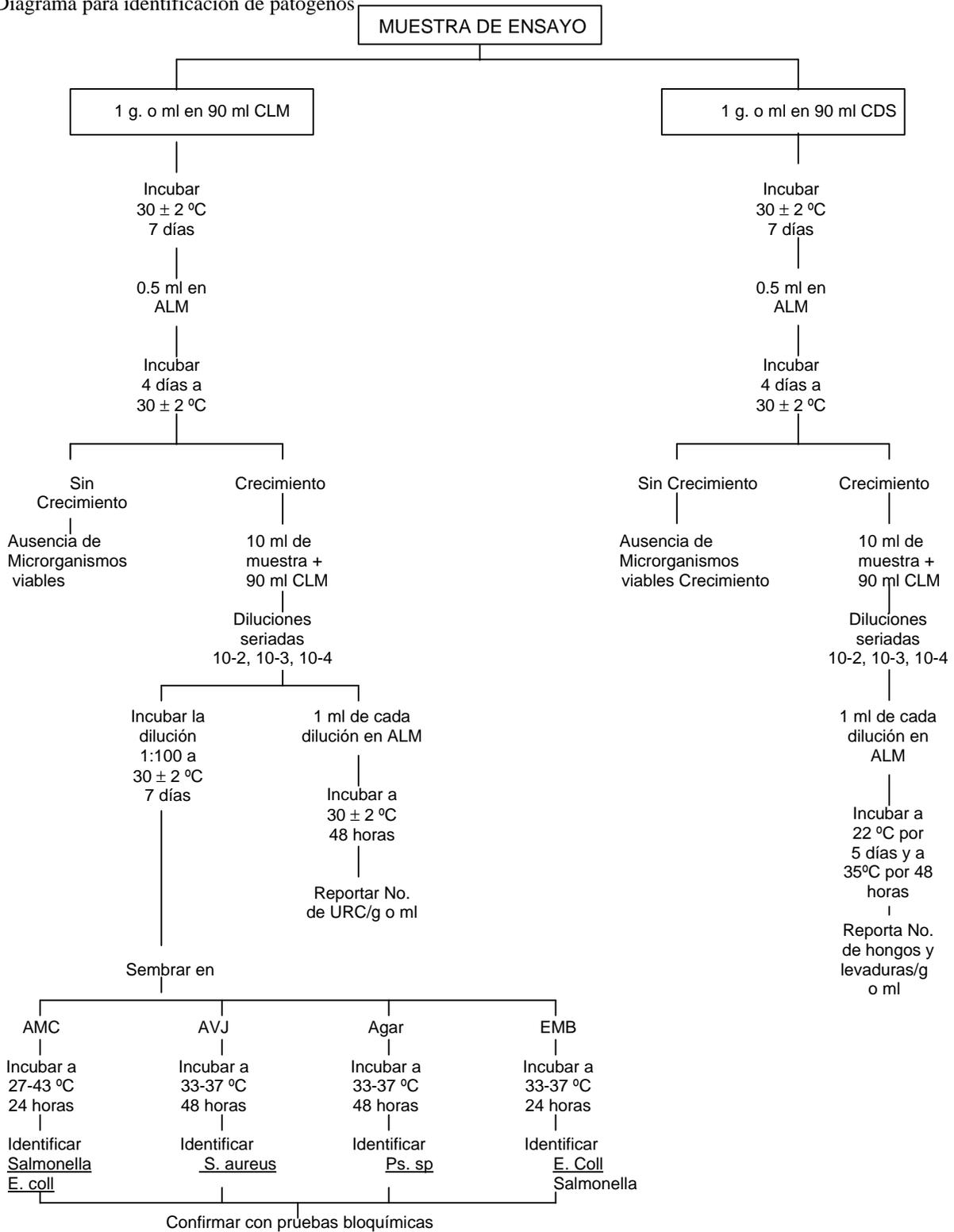
9.6.1 Procedimiento

Aislar la colonia sospechosa en ALM y los medios diferenciales que se mencionan: EMB (*E. coli*), AMC (*S. typhi*) y agar cetrimida (*Ps. sp.*). Incubar a 33-37°C durante 18-24 horas.

Sembrar el sistema API, siguiendo las indicaciones del fabricante. Leer las bioquímicas e identificar al microorganismo haciendo uso del manual de códigos. Corroborar que la morfología colonial de los medios diferenciales sea la correspondiente al microorganismo identificado por el sistema API.

9.7 Diagrama para identificación de patógenos

9.7 Diagrama para identificación de patógenos



10. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

11. Bibliografía

- 11.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, D.F.
- 11.2 Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. México, D.F.
- 11.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. México, D.F.
- 11.4 Secretaría de Salud. 1988. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 5a. Ed. México, D.F., pp. 201-209.
- 11.5 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Sistema General de Unidades de Medida. México, D.F.
- 11.6 Amador, L.R. 1982. Determinación de la enterotoxigenidad de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de productos cárnicos. Tesis profesional ENCB. IPN. México, D.F.
- 11.7 American Public Health Association. 1976. Compendium Methods for the Microbiological examination of foods. Intersociety Agency Committee on Microbiology Methods for Foods. Ed. Marvin L. Speck, pp. 399-407.
- 11.8 Bacteriological Analytical Manual. 1984. 6a. Ed. Capítulo 25, pp. 25-26
- 11.9 Cook M., Osol L. y Van Metek T. 1985. Formación Práctica de Regmington. 2a. Ed. UTEHA.
- 11.10 CTFA Microbiology Committee. 1985. Determination of the Microbial Content of Cosmetic Products (M-1) Microbiological Methods Section of the CTFA Technical Guidelines.
- 11.11 Deacon J.W. 1990. Introducción a la Micología Moderna, Ed. Limusa, S.A. de C.V., pp. 11-16.
- 11.12 Difco. Manual. 1974. 9th. Ed. Difco Laboratories Detroit Michigan, U.S.A., pp. 501-508.
- 11.13 Don J.J.J., Farmer III., Hickman F.W., Asbury M.A. and Steigerwalt A.G. 1977. Enterobacteriaceae. Center for Disease Control Atlants. G.A., p. 78.
- 11.14 Dr. Bradshaw L.J. 1973. Microbiología de Laboratorio. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., pp. 228-229.
- 11.15 Ewing W.H. and Martin W.J. 1980. Enterobacteriaceae Manual of clinical microbiology. Editors 2nd ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA, p. 207.
- 11.16 Ewing W.H. and Martin W.J. 1973. Enterobacteriaceae Manual of clinical microbiology. Editors 2nd ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA, pp. 15-16.
- 11.17 Herrera T., y Ulloa M. 1990. El reino de los Hongos. Micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica, pp. 19-23.
- 11.18 IPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 1983. Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria 1ra. Ed. México, D.F., p. 166.
- 11.19 Jay. J.M. 1978. Modern Food Microbiology. Second ed., pp. 321-347.
- 11.20 Lachica R.V.C., Genigeorgis y Horeprich P.D. 1971. Methacromatic agar Difusion Method for detecting Staphylococcal cleasa activity. Appl. microbiol 21. USA, pp. 585-587.
- 11.21 Lachica R.V.C., Weiss V.F. y Deibel R.H. 1969. Relationships among coagulase enterotoxin and heat stable deoxyribonucleasa. Production by *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol 18. USA, pp. 126-127.
- 11.22 Lennette E.H., Spauling y Traunt J.P. 1980, Enterobacteriaceas Manual of clinical microbiology. Edition 2nd. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA, p. 207.
- 11.23 MacFaddin J.F. 1980. Biochemical test for identification of Medical Bacteria. USA, pp. 220-226.
- 11.24 MacFaddin J.F. 1976. Biochemical test for Identification of Medical Bacteria. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, USA.
- 11.25 Merck E. 1990. Manual de Medios de Cultivo. Darnotadt, Alemania, pp. 206-207.
- 11.26 Ramírez. V.M.P. 1983. Correlación entre las pruebas de coagulasa y producción de enterotoxina de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de productos cárnicos. Tesis Profesional ENCB, IPN, México, D.F., p. 84.
- 11.27 Reyes. H.M.L. 1981. Determinación de la enterotoxigenicidad de cepas aisladas de quesos. Tesis profesional. ENCB, IPN, México, D.F., p. 64 y 346.
- 11.28 Rodríguez. M.R. 1980. Determinación de la toxigenicidad de cepas de *Staphylococcus aureus*. Tesis Profesional ENCB, IPN, México, D.F., p. 78.
- 11.29 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1981. Norma-Z-013/02. Guía para la redacción, estructuración y presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. México, D.F.

12. Observancia de la norma

La vigilancia en el cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud.

13. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor, con su carácter de obligatoria, a los treinta días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica. S